

戊型肝炎病毒 ORF2 片段在毕赤酵母中的 分泌表达及活性鉴定

刘如石^{1,2}, 邱义兰¹, 杨坤宇², 梁 良², 张 军², 夏宁邵^{1*}

(1. 湖南师范大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, 中国 长沙 410081)

(2. 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 中国 厦门 361005)

摘 要 为了寻求新型表达系统来研制戊型肝炎病毒基因工程疫苗, 利用 *Pichia pastoris* 表达系统表达戊型肝炎病毒(HEV) 结构区 ORF2 基因. 利用 PCR 扩增 HEV ORF2 基因, 然后将 ORF2 基因按正确的阅读框融合到 *Pichia pastoris* 分泌型表达载体 pPIC9K 的 α -因子信号肽编码序列 3' 端, 重组表达载体在电击转化毕赤酵母, 经过含 G418 的营养缺陷型培养基(RDB) 筛选、重组酵母基因组总 DNA 进行 PCR 鉴定后, 证实 HEV ORF2 基因已经整合到酵母基因组中并得到重组转化子. 表型鉴定后对 G418 具有不抗性的重组菌株诱导表达, 用双抗体夹心法 ELISA 筛选了表达外源蛋白的重组菌株, 再经 SDS-PAGE 与 Western blot 证实 ORF2 基因在 *Pichia pastoris* 中实现了分泌表达, 而且重组蛋白具有较强的特异性与生物学活性; 同时用双抗体夹心法证实在 *Pichia pastoris* 表达的上清中存在衣壳蛋白聚集体.

关键词 戊型肝炎病毒; 衣壳蛋白; 重组毕赤酵母

中图分类号 Q813

文献标识码 A

文章编号 1000-2537(2005)02-0057-05

Secreted Expression of Hepatitis E Virus ORF2 Gene in *Pichia pastoris* and Identification of Its Biological Activity

LIU Ru-shi^{1,2}, QIU Yi-lan¹, YANG Kun-yu², LIANG Liang², ZHANG Jun², XIA Ning-shao^{2*}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology Life Science College, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

(2. The key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract To find a new method to develop Hepatitis E Virus vaccine, ORF2 of Hepatitis E Virus(HEV) was expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. ORF2 of HEV was amplified by PCR and inserted into the right downstream of α -signal factor of the secreted expression vector pPIC9k. The recombinant expression vector pPIC9K was linearized, and then transformed into yeast *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant strains were screened by RDB plate including G418, and then the total DNA was extracted from the recombinant strains and analyzed by PCR. The results show that ORF2 of HEV was integrated into *Pichia pastoris* genome. After being identified their phenotype, the recombinant and biological activity was investigated by ELISA, SDS-PAGE, and Western blot. The result showed that recombination protein was successfully expressed and could be recognized by the McAb of HEV ORF2. At the same time, polymer was also found in recombinant protein by ELISA.

Key words Hepatitis E Virus; capsid protein; recombinant *Pichia pastoris*

戊型肝炎是近年新发现的一种严重危害人类健康的急性病毒性肝炎, 常见于发展中国家, 主要经过胃肠

收稿日期: 2005-02-11

基金项目: 福建省重大科技项目(2002F013).

作者简介: 刘如石(1971-), 男, 湖南涟源人, 湖南师范大学讲师, 博士.

道传播。戊型肝炎病毒为线状单股正链 RNA 病毒,全长约 7.2~7.6 kb,其基因组共有 3 个互相重叠的开放阅读框 ORF1、ORF2、ORF3,其中 ORF2 编码 660 个氨基酸的病毒主要结构蛋白,现已证实 HEV ORF2 存在多个免疫性抗原表位、B 细胞抗原表位以及产生中和抗体的抗原表位,因此 HEV 重组疫苗的研制主要集中在 ORF2 基因^[1]。本实验室已经在大肠杆菌中表达了该段基因,表达蛋白复性后能够形成类病毒颗粒,免疫恒河猴后可以产生中和抗体,抵抗高滴度的 HEV 攻击而不发病,因此具有成为疫苗的良好前景^[2];但是大肠杆菌表达的蛋白以包涵体的形式存在,一般情况下蛋白质很难正确折叠,不能进行翻译后的加工和糖基化等问题;杆状病毒表达产物尽管免疫原性好,但是受到昆虫蛋白异质性的限制,目前美国 FDA 尚没有批准应用该系统作为疫苗开发的工具。毕赤酵母系统是近年来发展较快的一个真核表达系统,比啤酒酵母更适于表达真核蛋白,同时具有原核细胞良好的可操作性和真核系统翻译后加工的双重特点,是外源基因表达的理想宿主^[3]。本研究利用 PCR 技术扩增 HEV ORF2 片段,克隆于 *Pichia pastoris* 酵母分泌表达载体 pPIC9K α -信号肽的下游,表达了具有与相应的单克隆抗体反应的具有较强特异性与生物学活性的重组蛋白,为加速戊型肝炎病毒疫苗的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与单克隆抗体 宿主大肠杆菌 TOP10F[']、酵母分泌型表达质粒 pPIC9K、酵母 GS115 菌株购自 Invitrogen 公司;克隆质粒 pMD 18-T 购自 Takara 公司;pTO-T7-ORF2 由本实验室构建与保存^[4];HEVORF2 单克隆抗体 8C11、16D7^[5]由本实验室筛选保存。

1.1.2 酶、试剂与培养基 限制性内切酶 Hind III、EcoR I、Sal I 购自 Takara 公司,T4DNA 连接酶、Taq 酶购自 Takara 公司。ORF2 结构蛋白扩增引物:5'端引物 EHEFP(5'-GAATTCACCACCATGATAGCG CITACCTGTTC-3')引入酶切位点 EcoR I,3'端引物 EHERP(5'-GAATTCATTAACCTCC CGAGTTTACG-3')也引入 EcoR I 酶切位点由上海博亚公司合成;重组酵母 PCR 鉴定引物 5' AOX1(5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGG-3')与 3'-AOX1(5'-GCA AATGGCATTCTGACA TCG-3')。培养基:LB,YPD, RDB, MM/MD, BMGY/BMMY 按 Liu 等^[6]的方法配制。

1.2 方法

1.2.1 酵母表达载体的构建 以 pTO-T7-ORF2 为模板,EHEFP 与 EHERP 为引物扩增出 ORF2 片断。PCR 条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 50 s,57 ℃ 50 s,72 ℃ 50 s,共 20 个循环;最后 72 ℃ 10 min。PCR 扩增片段连接到 pMD 18-T 克隆载体,得到插入 ORF2 基因的亚克隆,质粒经扩增后转化大肠杆菌 TOP 10F['],EcoR I 单酶切回收 ORF2 片断并连接到 EcoR I 单酶切的酵母分泌型表达质粒 pPIC9K 上构建表达载体。

1.2.2 pPIC9K-ORF2 转化酵母 GS115 按 Liu^[6]等的方法转化毕赤酵母 GS115 菌株,然后立即加入预冷的 RDB 液体培养基,在恒温振荡器上 30 ℃、250 r/min 培养 90 min,然后涂布 200 μ L 于加有 0.5 mg/mL G418 的 RDB 平板上,30 ℃恒温培养 2~3 d,每天观察转化子的生长状况。

1.2.3 重组菌株高拷贝与表型的筛选 先将在 0.5 mg/mL G418 的 RDB 平板上生长的菌株用无菌牙签分别接种到 G418 浓度分别为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mg/mL 的 YPD 平板上,确定每个菌株对 G418 的抗性。再将这些菌株分别接种到新的 MM 与 MD 平板上以确定其表型,然后分别接种于 3 mL YPD 培养基中培养过夜,按 Alison Adams 方法稍加改进提取酵母染色体总 DNA,以引物对 5' AOX1 与 3' AOX1 对整合到 GS115 染色体中的 HEVORF2 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为:95 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 50 s,72 ℃ 3 min,共 30 个循环;72 ℃ 10 min。接着进行琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆。

1.2.4 诱导表达 接种单菌落于 50 mL BMGY 培养基中,29 ℃培养至 OD₆₀₀为 4~5 h,1 500 g 离心 4 min 收集菌体,用 10 mL BMMY 培养基重悬,在 29 ℃培养,每 12 h 取 400 μ L 培养液 8 000 g 离心 1 min 收集上清液;菌体沉淀用无菌水洗涤离心,用 Pierce 公司生产的酵母蛋白抽提试剂提取细胞内蛋白,表达上清与菌体裂解抽提液都置-20 ℃保存。同时补加 100% 甲醇到培养基中保持甲醇终浓度为 0.6%。以转化 pPIC9K 空载体的 GS115 菌株以同样的条件培养诱导做阴性对照。

1.2.5 表达蛋白的检测 1) ELISA 检测表达蛋白的活性 以本实验室建立的双抗体夹心法检测重组蛋白的活性;(1)包被按一定比例混合而成 HEVORF2 多种鼠源单克隆抗体,如检测重组蛋白聚体则只包被单克隆

抗体 8C11; (2) 加适当稀释的诱导表达上清; (3) 加 HRP 标记的 HEVORF2 单克隆抗体 8C11; (4) 加入显色底物显色; (5) 2 mol/L 硫酸终止反应, 在酶标仪上测定反应各孔的 A450 nm/620 nm 值. 当以 EIA 检测聚体时, 以大肠杆菌表达复性的 HEVORF2 类病毒颗粒作阳性对照, 以转化空载体的酵母表达上清为阴性对照.

2) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳与 Western Blotting 鉴定 按文献 Laemmli 方法进行 SDS-PAGE 电泳, 然后再按如下步骤: 进行 Western Blotting 分析: (1) 用 Bio-Rad 半干转移装置将蛋白转移到硝酸纤维素薄膜 (NC) 上; (2) 5% 脱脂奶 1xTN 液 37 °C 封闭 2 h; (3) 加入鼠源 HEV-ORF2 单克隆抗体 (1:1 000), 37 °C 温育 1 h; (4) 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:7 500), 37 °C 温育 1 h; (5) 加入 NBT/BCIP 显色液显色 15 min, 去离子水终止反应.

2 结果与分析

2.1 酵母表达载体的构建与鉴定

以 pTQ-T7-ORF2 为模板, EHEFP 与 EHERP 为引物扩增出 ORF2 片段, PCR 扩增片段回收后连接到 pMD 18-T 克隆载体, 得到插入 ORF2 基因片段的亚克隆, 质粒经扩增后转化大肠杆菌 TOP10⁺, EcoR I 单酶切回收 ORF2 片段并连接到同样处理的酵母分泌型表达质粒 pPIC9K 上构建表达载体 pPIC9K-ORF2 (如图 1), 用 EcoR I 单酶切重组载体能切出与 ORF2 片段大小一致的片段 (图 2 Lane 4), 说明有目的片段插入; 再用 Hind III 单酶切重组载体, 其酶切出的片段的数目和大小与预期的正向插入克隆酶切结果一致 (图 2 Lane 1). 同时以 Hind III 酶切没有插入片段的空载体, 酶切结果也与预期的结果相同 (图 2 Lane 2), 说明酶切系统正常. 然后经博亚测序证明 ORF2 基因已整框插入到表达载体中.

2.2 重组酵母的筛选

由于受体酵母 *P. pastoris* 为 His 缺陷型, 而且没有 Kanamycin 基因, 对 G418 没有抗性, 重组载体带有 His4 基因而不能起始复制, 这样在不加 His 但是加有 G418 的基本培养基 RDB 上只有重组酵母表达载体整合到酵母染色体上的重组酵母才能正常生长. 经过 MD 与 MM 培养基筛选后阳性克隆全部为 HIS⁺ MUT⁺ 转化子, 阳性克隆再经过 G418 浓度梯度筛选得到对 G418 不同浓度具有抗性的重组菌. 阳性酵母再以 5' AOX1 引物与 3' AOX 引物进一步进行 PCR 鉴定 HEV ORF2 基因与酵母染色体整合 (图 3). 结果说明 pPIC9K-ORF2 转化酵母后外原基因 HEV-ORF2 全部为单交换插入宿主基因组而产生甲醇利用快速的表型 (Lane 2, 3), 与 MD 和 MM 确定的表型完全一致. PCR 分析不仅验证了 pPIC9K-ORF2 已经插入了酵母染色体中, 而且可以进一步鉴定转化子的表型.

2.3 重组蛋白的表达

用双抗体夹心法 ELISA 对 G418 抗性不同的 HIS⁺ MUT⁺ 转化子进行表达筛选时发现, 诱导表达上清与 HEV-ORF2 抗体有较强的结合力, 说明表达蛋白具有有良好的生物学活性 (图 4), 而且 HIS⁺ MUT⁺ 表型中基因剂量与重组蛋白表达呈现正相关, 即含多拷贝外源基因的转化子表达量明显高于低拷贝转化子, 而且基因拷贝数增加, 外源蛋白表达量也随之增加, 重组菌株在第一天就有一定水平的表达, 随着时间的延长表达量也逐渐提高, 在诱导表达后的第 5 d 达到表达高峰, 共筛选到两株高表达菌株. 表达量达到最大值时, 对 G418 4.0 mg/mL 具有抗性菌株的表达量为对 G418 1.0 mg/mL 具有抗性菌株的约 100 倍, 然后表达量缓慢下降. 这

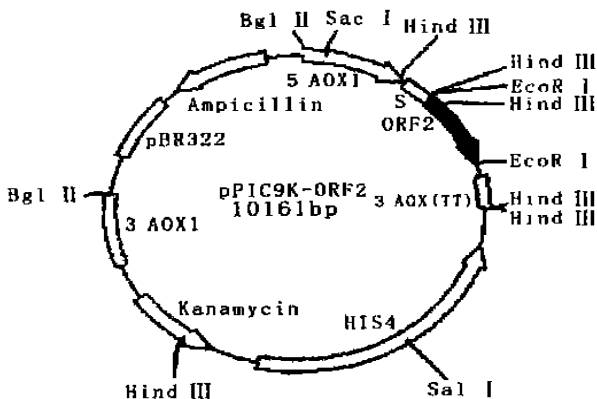
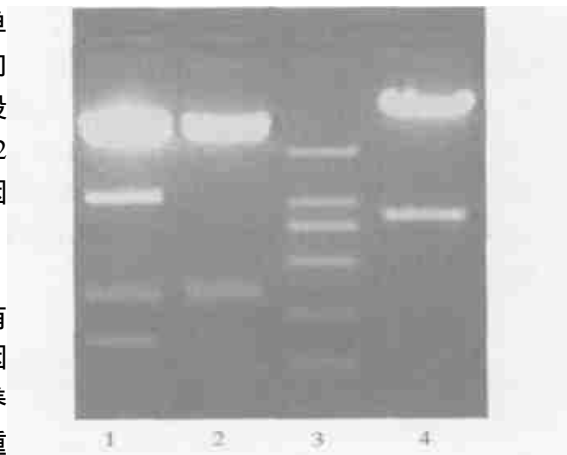


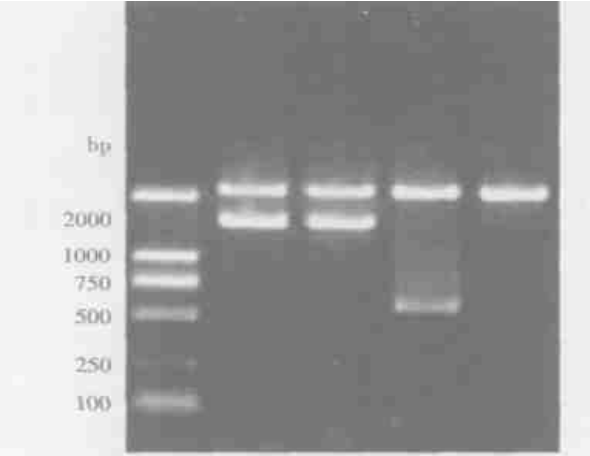
图 1 pPIC9K-ORF2 表达载体的构



第 1 泳道: pPIC9K-ORF2 Hind III 酶切, 第 2 泳道: pPIC9K Hind III 酶切, 第 3 泳道: DNA 分子量标准 (从上至下分别为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp); 第 4 泳道: pPIC9K-ORF2 EcoR I 酶切

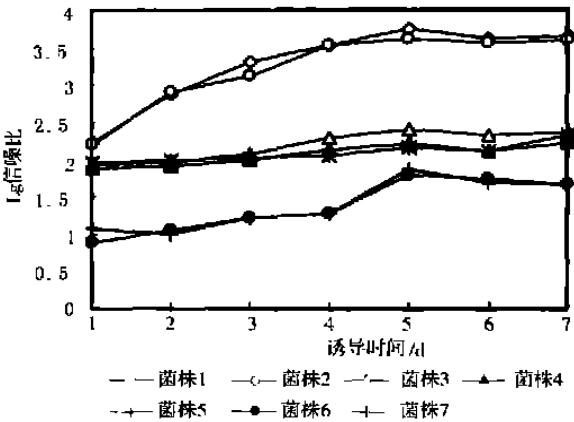
图 2 pPIC9K-ORF2 重组质粒与 pPIC9K 酶切鉴定

可能是由如下两种原因造成的: 其一是后期酵母分泌的胞外蛋白酶也增加, 对重组蛋白的降解加快; 其二是随着发酵的进行, 有害代谢物的不断积累不利于重组蛋白的表达. 而破碎细胞提取液上清经 ELISA 检测后, 检测到的蛋白活性很低, 说明实现了重组蛋白的高效分泌.



第 1 泳道: DNA 分子量标准; 第 2、3 泳道: HIS⁺ MUT⁺ 总 DNAPCR 扩增; 第 4 泳道: 仅转化 pPIC9k 质粒重组菌株总 DNAPCR 扩增; 第 5 泳道: *P. pastoris* GS115 菌株总 DNAPCR 扩增

图 3 PCR 分析重组 *P. pastoris* GS115 克隆



菌株 1、2, 为对 G418 4.0 mg/mL 有抗性, 菌株 3、4、5 为对 G418 2.0 mg/mL 有抗性, 菌株 6、7 为对 G418 1.0 mg/mL 有抗性

图 4 外因基因 剂量与重组蛋白的关系

2.4 对表达蛋白聚体的检测

用本实验室建立的双抗体夹心法来检测表达上清的聚体情况, 先分别包被鼠源 HEVORF2 单克隆抗体 8C11 或 16D7 于 96 孔板, 封闭后加入 100 μ L 表达上清, 然后用相应的酶标单抗来检测, 即用 8C11 单抗包被的板显色时用标酶 8C11 单抗来反应. 稀释 10 倍后两个高产菌株表达上清与两种鼠源单克隆抗体都有反应 (表 1), 说明表达的重组蛋白有聚体存在, 因而可以证明表达的重组蛋白以聚体的形式存在, 具有作为诊断试剂与疫苗的开发前景.

表 1 毕赤酵母表达重组蛋白同源二聚体的 ELISA 检测

| 检 测 方 法 | 菌株 1 表达上清 | 菌株 2 表达上清 | 阳性对照 | 阴性对照 |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | A450 nm/ 620 nm | A450 nm/ 620 nm | A450 nm/ 620 nm | A450 nm/ 620 nm |
| 8C11 双抗体夹心法 | 2. 231 | 2. 54 | 2. 41 | 0. 13 |
| 16D7 双抗体夹心法 | 2. 535 | 2. 84 | 2. 76 | 0. 24 |

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 与 Western-blot 分析

重组酵母 30 $^{\circ}$ C 诱导 120 h 后离心收集表达上清, 重组菌株表达上清与对照上清经切向流浓缩 10 倍, 将浓缩上清进行 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 5. 在胶上约在 30 kD 处可见重组阳性菌株表达有独特电泳条带 (图 5A, Lane 2), 其分子量与预期的 ORF2 蛋白分子量大小很接近, 而在仅转化空载体的菌株没有电泳条带 (图 5A, Lane 3), 说明 HEVORF2 结构蛋白在毕赤酵母中成功地实现了分泌表达. Western-blot 结果表明 (图 5B, 5C), 酵母表达上清蛋白与鼠源单克隆抗体 8C11 及 16D7 反应, 经过同样处理的仅转化空载体菌株的表达上清对鼠源单克隆抗体 8C11 及 16D7 没有反应, 进一步说明 HEVORF2 结构蛋白在毕赤酵母中获得了分泌表达, 而且具有良好的生物活性与单克隆抗体反应的特异性. 因而 HEVORF2 结构蛋白在毕赤酵母中的表达为研究开发戊型肝炎诊断试剂与重组疫苗打下了坚实的基础.

3 讨论

毕赤酵母 *Pichia pastoris* 自 20 世纪 90 年代初期被开发为外源蛋白表达系统以来一直受到人们的重视.

主要原因是它与酿酒酵母 *S. cerevisiae* 一样易于操作培养; 具有受甲醇严格诱导调控的强启动子 AOX1; 高密度发酵技术成熟、高分泌能力强、产物易于提纯; 表达菌株稳定, 能正确翻译而且翻译后加工等特点. 更接近于高等真核生物, 所有这些为工业化生产与纯化提供了极大的方便. 利用强效可调控的 AOX1 启动子, 人们已经高效表达了 HBsAg, TNF, EGF, 人血清白蛋白等多种外源基因.

表达载体与酵母染色体有单交换和双交换两种形式: 单交换整合或插入 AOX1 位点, 或插入 His4 位点; 转化后形成的不同表型对表达外源蛋白也有影响. 本研究用 *Sal* I 线性化重组载体 pPIC9K-ORF2 后转化 GS115 酵母后, 仅产生了 HIS⁺ MUT⁺ 型阳性克隆. 用酵母菌落 PCR 筛选重组转化子, 可以减少工作量, 提高工作效率. 但是由于酵母细胞壁结构坚韧, 难以裂解, 同时由于一些未知的原因, 菌落 PCR 常常出现假阴性, 其可靠性受到质疑. 本研究采用先提取总 DNA 然后再进行 PCR 扩增的方法来鉴定阳性克隆, 虽然步骤较繁琐, 但是准确率高, 并且可以一步鉴定重组子的表型.

外源基因的拷贝数一般来说是影响表达量的一个重要因素, 整合的拷贝数越高, 表达量越大. 本研究发现在同一种表型中, 对 G418 不同浓度具有抗性的菌株在相同条件下诱导表达, 发现表达量与基因剂量正相关, 即外原基因拷贝数越高, 蛋白表达量越大, 说明基因的剂量明显影响外源蛋白的表达水平. 但绝非绝对, 有时单拷贝与多拷贝对表达量没有影响, 有时甚至多拷贝菌株的表达量反而下降.

某些蛋白质在中性 pH 条件下易受到蛋白酶分解. 由于 GS115 酵母并非蛋白酶缺陷型菌株, 其分泌蛋白易受蛋白酶的影响. 有人报道在 pH 6.0 的缓冲培养基中添加 1% 的 Casaminoacids 可以缓解细胞外蛋白酶对外源蛋白的降解, 使鼠表皮生长因子的产量提高; 本研究在实验中使用了 BMGY/ BMMY, MGY/MMY, MG/ MM3 种培养基诱导培养, 在 MGY/MMY, MG/MM 中表达量极低, 在 BMGY/ BMMY 中表达量较高. 也有人报道 EDTA 能够抑制胞外蛋白酶的活性. 另外当在 BMGY/ BMMY 中添加 5 mmol/L EDTA 后, 重组酵母的生长缓慢, 表达水平下降, 与文献报道不符, 这可能是由于 EDTA 与培养基中的 Ca²⁺ 等离子结合后, 虽然抑制了外源蛋白酶的活性, 但是由于被酶水解产生的一些小分子肽及氨基酸也明显降低了, 而这些物质可能是酵母生长的生长因子或合成外源蛋白的前提物质, 因而降低了外源蛋白的产量.

参考文献:

[1] BRYAN JP, TSAREV SA, IQBAL M, *et al.* Epidemic hepatitis E in Pakistan pattern of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease[J]. *Infect Dis*, 1994, 170(3): 521- 521.

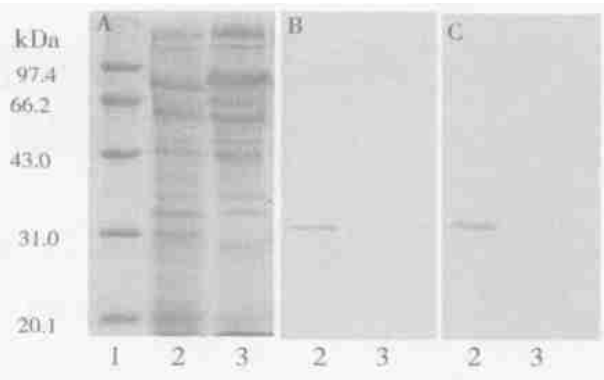
[2] 葛胜祥, 张 军, 黄果勇, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 多肽对恒河猴的免疫保护研究[J]. *微生物学报*, 2003, 43(1): 235-242.

[3] BATHUSF IC. Protein expression in yeast as approach to production of recombinant malaria antigens[J]. *Am J trop Med Hyg*, 1994, 50: 20- 26.

[4] 李少伟, 张 军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究[J]. *生物工程学报*, 2002, 12(4): 453- 467.

[5] 顾 颖, 张 军, 李少伟, 等. 生物传感器对戊型肝炎病毒单克隆抗体部分特性的研究[J]. *细胞与分子免疫学*, 2002, 18(6): 617- 620.

[6] LIU RS, YANG KY, LIN J, *et al.* High yield expression of recombinant SARS coronavirus nucleocapsid protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(24): 3 602- 3 607.



A1: 蛋白质相对分子质量标准; A2: 重组阳性菌株表达上清; A3: 阴性对照菌株表达上清对 8C11 单抗反应; B2, B3: 重组阳性菌株与阴性菌株表达上清分别对 8C11 单抗反应; C2, C3: 重组阳性菌株与阴性对照菌株表达上清分别对 16D7 单抗反应.

图 5 重组蛋白 SDS-PAGE 与 Western blot 分析